

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Будкиной Ольги Александровны

«Структурно-функциональные закономерности воздействия амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки»,

представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки, 03.01.04 – биохимия, химические науки.

Блок-сополимеры этиленоксида и пропиленоксида (ПО), известные под торговой маркой Pluronic® (плюроники), представляют собой семейство амфифильных сополимеров, широко востребованных в самых разных областях. В конце 80-х годов было обнаружено, что плюроники обладают относительно низкой токсичностью. Это открыло широкие перспективы использования этих полимеров в медицине. Исследование поведения плюроники в биологических системах показало, что они способны усиливать иммунный ответ, влиять на метаболизм холестерина, ингибировать мембранные насосы, обуславливающие множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток.

Природная или развивающаяся в процессе химиотерапии множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток является одним из главных факторов, лимитирующих эффективность многих противоопухолевых препаратов, в том числе и доксорубина. Хорошо известно, что среди биохимических механизмов, определяющих развитие МЛУ, ведущую роль может играть гиперэкспрессия генов, кодирующих отдельные белки семейства АВС-транспортеров. Эти белки локализируются на мембране клеток и препятствуют накоплению эффективных доз лекарственных препаратов определенных групп в опухолевых клетках.

Следует отметить, что механизмы биологического действия плюроники во многом не ясны. Недостаточно изучена их цитотоксичность, информация о влиянии химической структуры на биологическую активность весьма фрагментарна. Поэтому цель диссертационной работы О.А. Будкиной, сформулированная как выявление взаимосвязи между структурой, химической природой, способностью к мицеллообразованию водорастворимых неионогенных амфифильных блок-сополимеров и углеводородсодержащих ПАВ и их биологическими эффектами: влиянием на жизнеспособность опухолевых клеток и на их устойчивость к действию лекарств, безусловно, является **актуальной** как с научной, так и с практической точки зрения.

Для выполнения поставленной цели автором были поставлены и решены следующие три задачи: исследовать способность амфифильных блок-сополимеров к мицеллообразованию; на одной линии раковых клеток изучить влияние рассматриваемых соединений на жизнеспособность клеток в культуре и их устойчивость к лекарствам; определить локализацию тех же соединений при их взаимодействии с раковыми клетками.

Диссертационная работа О.А. Будкиной построена по классическому образцу и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, описание результатов исследования и их обсуждение, выводы и список литературы. Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста, содержит 42 рисунка, 9 таблиц.

Во введении автором обосновывается актуальность работы и формулируются цели и задачи.

Обзор литературы занимает 29 стр. и представлен четырьмя разделами. Первый из них посвящен описанию физико-химических свойств и особенностей синтеза амфифильных блок-сополимеров – плуроников, полиглицеринов, сополимеров на основе полидиметилсилоксана, а также автор рассматривает особенности строения плазматической мембраны и взаимодействие амфифильных блок-сополимеров с модельными липидными мембранами. Во втором разделе рассматривается феномен множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток и возможности ее преодоления с использованием плуроников. Подробно анализируются современные представления о возможных механизмах подавления активности Р-гликопротеина плурониками. Третий раздел посвящен описанию побочных эффектов (токсичности) различных плуроников и анализу как механизмов токсичности, так и обнаруженных закономерностей структура-токсичность. В четвертом разделе обсуждается защитное действие плуроников.

Обзор литературы написан прекрасным литературным языком, легко читается, охватывает все современные сведения по изучаемым вопросам, полностью вводит читателя в круг анализируемых автором проблем и оставляет самое благоприятное впечатление. В качестве замечания можно отметить, что в разделе, посвященном МЛУ, следовало бы упомянуть, что кроме Pgp170 есть и другие ABC-транспортеры, играющие важную роль в развитии МЛУ опухолевых клеток. А также привести современную классификацию (MDR1 – ABCB1, MRP – ABCC1 и т.д.).

В главе "Экспериментальная часть" (20 стр.) очень подробно и тщательно описаны все использованные автором материалы и методы, с помощью которых проведено исследование. Все использованные методы адекватны поставленным задачам и позволяют считать приведенные в работе результаты **достоверными**.

Собственные результаты автора и их обсуждение (56 стр.) изложены в главе "Результаты и их обсуждение" в пяти разделах. В первом разделе "Характеристика исследованных соединений" автор дает характеристику использованным в работе 16 амфифильным соединениям, различающимся по химической природе гидрофобного блока и гидрофильного блоков, по архитектуре гидрофильного блока и по степени блочности. Автором был рассчитан гидрофильно-липофильный баланс этих соединений и с помощью двух методов экспериментально определена критическая концентрация мицеллообразования. При этом были тщательно проанализированы различные факторы, влияющие на точность определения ККМ и определено, что основными факторами являются гетерогенность препаратов полимеров, их изменение в процессе хранения и некорректное использование метода определения ККМ с помощью дифенилгексатриена.

Во втором разделе "Цитотоксичность исследованных соединений" приведены результаты исследования собственной токсичности *in vitro* исследуемых амфифильных соединений и противоопухолевого антибиотика доксорубина на модели клеток аденокарциномы молочной железы человека MCF7/R, устойчивых к доксорубину, а также определены значения наибольшей нетоксичной концентрации (ННК) для каждого из амфифильных соединений. Автором была разработана методика, позволяющая исключить влияние сыворотки на взаимодействие полимеров с клетками. Впервые была выявлена токсичность гидрофильных плуроников F68 и F127 по отношению к клеткам в культуре и определены значения ННК этих полимеров. Также впервые были определены наибольшие нетоксичные концентрации плуроников L81, F87, полиглицеринов и сополимера на основе полидиметилсилоксана.

Было обнаружено, что с повышением гидрофильности блок-сополимера снижалась его токсичность, что приводило к увеличению значения ННК. При этом токсичность полимеров слабо зависела от особенностей химической структуры гидрофильного и гидрофобного блоков, а в основном определялась их соотношением. В результате анализа была выведена эмпирическая формула зависимости значений IC50 для полимеров от их гидрофильно-липофильного баланса. Сопоставление цитотоксичности и мицеллообразования исследованных соединений позволило сделать вывод, что большинство блок-сополимеров проявляют цитотоксичность только в форме мицелл.

В следующем разделе "Увеличение жизнеспособности клеток под действием ПЭО-содержащих блок-сополимеров" диссертант исследовал феномен стимуляции роста клеток MCF7/R под действием плороников. Полимеры, содержащие линейный ПЭО в качестве гидрофильного блока (за исключением плороника L81 и углеводородсодержащих ПАВ) стимулировали рост клеток, причем эффект наблюдался как в присутствии мицелл, так и юнимеров. Автор предположил, что в основе защитных свойств ПЭО-содержащих амфифильных незаряженных блок-сополимеров лежит кооперативное взаимодействие этиленоксидных звеньев с гидроксильными группами углеводных цепочек на поверхности клеток с образованием сетки водородных связей, стабилизирующих клеточную мембрану.

В четвертом разделе "Влияние исследованных соединений на устойчивость раковых клеток к доксорубину" представлены результаты влияния амфифильных блок-сополимеров на чувствительность клеток MCF7/R к доксорубину. Обнаружено, что добавление к клеткам плороника L61 в нетоксичных концентрациях значительно (до 30 раз) усиливало эффективность действия доксорубина. Для всех полимеров была определена минимальная концентрация полимера, достаточная для подавления лекарственной устойчивости. Также в этом разделе автор проанализировал особенности действия некоторых блок-сополимеров на МЛУ клеток MCF7/R, получив 5 вариантов ответа клеток. Причем один и тот же амфифильный блок-сополимер может вызывать три разных концентрационно-зависимых эффекта: в области низких концентраций (ниже ККМ) полимеры подавляют МЛУ опухолевых клеток, и это определяется взаимодействием гидрофобного блока с липидами клеточной мембраны; при увеличении концентрации наблюдается стимуляция пролиферации, обусловленное строением и размерами гидрофильного блока сополимера. Дальнейшее повышение концентрации полимера вызывает гибель клеток, обусловленную действием мицелл полимеров.

Обнаруженные в результате проведенных исследований закономерности позволили автору предложить вероятный механизм подавления МЛУ полимерами на основе взаимодействия их с плазматической мембраной.

В последнем разделе приведены результаты исследования локализации полимеров в клетках, для чего О.А. Будкиной были получены флуоресцентно-меченые производные полимеров. Но оказалось, что ковалентное присоединения FITC радикально меняет свойства полимеров. Поэтому для проверки полученных результатов был проведен автордиографический анализ с использованием плороников, меченных тритием. Использование двух разных подходов, а также варьирование способов фиксации показало, что FITC- и [³H]-меченые полимеры локализовались в различных областях клеток: FITC-меченые проникали внутрь клеток, тогда, как меченные тритием соединения в основном детектировались на поверхности. Сопоставление данных по цитотоксичности, влиянию полимеров на жизнеспособность и лекарственную устойчивость клеток - и результатов

радиоавтографии свидетельствует о том, что взаимодействия полимера с наружной клеточной мембраной достаточно для проявления его биологических эффектов.

Результаты исследований подробно описаны и иллюстрированы 34 рисунками и 7 таблицами и замечаний по этому разделу работы нет.

Полученные результаты обсуждаются автором в соответствующих разделах и в **Заключении**.

Все пять выводов диссертационной работы логично вытекают из полученных данных. Выводы О.А. Будкиной основаны на большом количестве экспериментального материала, соответствуют поставленным в диссертации задачам и полностью соответствуют представленным результатам.

Список литературы содержит ссылки на 212 публикаций.

Диссертационная работа О.А. Будкиной обладает несомненной **новизной**. Диссертантом впервые было обнаружено, что макромолекулярная структура и химическая природа гидрофильного блока амфифильных блок-сополимеров определяют эффект поддержания жизнеспособности опухолевых клеток. Впервые было проведено систематическое исследование цитотоксичности ряда амфифильных блок-сополимеров и показано, что их цитотоксические концентрации зависят от массовой доли гидрофильного блока, а само свойство – цитотоксичность – для большинства блок-сополимеров обусловлено их способностью образовывать мицеллы. Впервые были определены минимальные концентрации полимеров, достаточные для подавления МЛЮ, и показано, что способность амфифильных блок-сополимеров подавлять МЛЮ определяется объемом гидрофобного блока и общей гидрофобностью полимера.

Практическая значимость диссертационного исследования О.А. Будкиной: предложена эмпирическая зависимость, описывающая корреляцию между гидрофильно-липофильным балансом незаряженного амфифильного блок-сополимера и его цитотоксичностью, которая может быть использована для прогнозирования области цитотоксических концентраций блок-сополимеров при их практическом применении. Предложена методика определения наименьших оптимальных концентраций полимеров для максимально возможного подавления МЛЮ раковых клеток.

Личный вклад автора заключается в участии автора во всех этапах диссертационного исследования: в планировании и постановке задач; в сборе и анализе литературных данных; в непосредственном участии в научных экспериментах, в обработке, анализе и обсуждении полученных результатов; в подготовке публикаций по теме выполненного исследования.

Основные результаты диссертационной работы были доложены на двух международных конференциях.

Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации. Материалы диссертационной работы широко представлены в отечественных и международных научных изданиях.

По своему содержанию, объектам и методам исследования диссертация О.А. Будкиной соответствует пунктам 1, 2, 5, 14 паспорта специальности 03.01.04 – биохимия и пунктам 3, 4, 8 паспорта специальности 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки. В диссертации О.А. Будкиной предложено решение задач, имеющих существенное значение для междисциплинарных исследований в области биохимии и химии высокомолекулярных соединений, а именно: показано, что амфифильные блок-сополимеры вызывают три различных биологических эффекта в зависимости от

концентрации, которая, в свою очередь, определяется химическим строением макромолекулы.

Диссертационная работа О.А. Будкиной «Структурно-функциональные закономерности воздействия амфифильных блок-сополимеров на раковые клетки» является цельной законченной научно-квалификационной работой, которая по своему содержанию, уровню проведенных исследований, актуальности выбранной темы, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости в полной мере отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 24.09.13 № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор – О.А. Будкина заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки, и 03.01.04 – биохимия, химические науки.

Официальный оппонент
доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Лаборатории стволовых клеток
Курчатовского комплекса НБИКС-
технологий ФГБУ Национальный
исследовательский центр "Курчатовский
институт"
E-mail: galinapo@gmail.com

Телефон: +8(499)1967100 доб. 6683

Почтовый адрес организации:
123182 Россия, Москва,
пл. Академика Курчатова, д. 1

Посьпанова
Галина Ароновна

«28» мая 2015 г.

Подпись Г.А. Посьпановой заверяю
Первый заместитель директора по научной
работе НИЦ "Курчатовский институт"
доктор технических наук,
член-корреспондент РАН,
профессор



Нарайкин
Олег Степанович